

DER EINFLUSS VON CARBENOXOLON AUF DIE IN VITRO
DNS- UND PROTEINSYNTHESE DER MAGENSCHLEIMHAUT
VON MENSCH UND RATTE

von
Gunawan Sutrisno
aus
Jakarta/Indonesien

1979
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie

der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Professor Dr. C.-J. Estler

DER EINFLUSS VON CARBENOXOLON AUF DIE IN VITRO
DNS- UND PROTEINSYNTHESE DER MAGENSCHLEIMHAUT
VON MENSCH UND RATTE

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Alexander-Universität

Erlangen-Nürnberg



vorgelegt

von

Gunawan Sutrisno

aus

Jakarta/Indonesien

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten
Referent: Prof. Dr. P. Mitznegg
Korreferent: Prof. Dr. C.-J. Estler

Tag der mündlichen Prüfung: 19.11.1979

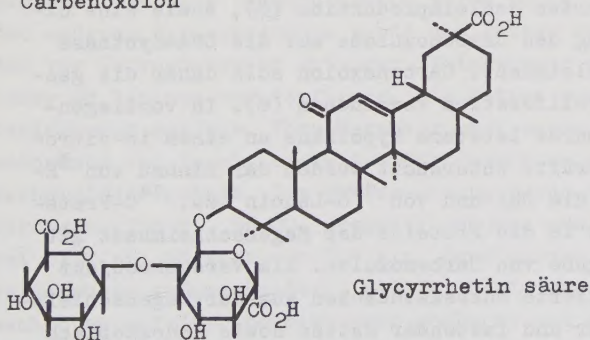
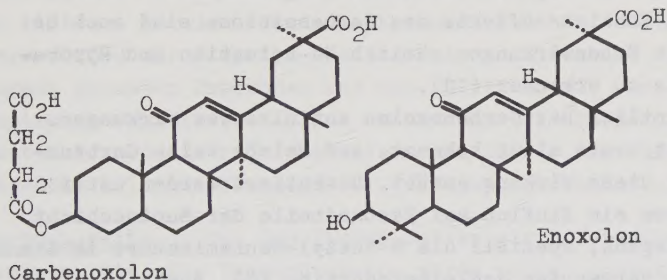
INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
II. Methodik	3
III. Ergebnisse	9
A.I. Versuche bei normal gefütterten Ratten ...	9
A.II. Versuche bei 24 Stunden fastenden Ratten..	11
B.I. Versuche bei magengesunden Menschen	14
B.II. Versuche bei Ulkus-ventriculi-Patienten ..	17
IV. Diskussion der Versuchsergebnisse	21
V. Zusammenfassung	24
VI. Literatur	26

Lebenslauf

I. EINLEITUNG

Carbenoxolon (3 β -(3-Carboxy-propionyloxy)-11-oxo-olean-12-en-30 säure.) ist das synthetische Hemisuccinat der Glycyrrhetinsäure, die als Inhaltstoffe im Sucus Liquiritiae enthalten ist.



Carbenoxolon hat nach parenteraler nicht aber nach oral-
 er Gabe antiphlogistische Wirkung, annähernd 1/3 der
 des Cortisols (10,12). Die antiphlogistische Wirkung
 von Carbenoxolon wurde zum ersten Mal von Finney und
 Somers 1958 beschrieben (7), und von Khan und Sulli-
 van 1968 bestätigt (10). Den vollen antiphlogistischen
 Effekt hat Carbenoxolon auch bei hypophysektomisierten
 Ratten, dagegen ist der Effekt bei adrenalektomisierten
 Ratten merklich reduziert. Das deutet darauf hin, daß

ein Teil der antiphlogistischen Wirkung von der endogenen Steroidproduktion abhängig ist. Der Effekt ist ACTH-unabhängig und wäre durch eine direkte Wirkung auf Corticosteroidfreisetzung aus den Nebennieren oder alternativ durch eine Wirkungsverstärkung der endogenen Corticoide zu erklären. Eine ähnliche Wirkungsweise wird dem Aldosteron zugeschrieben. Aldosteron-ähnliche Effekte des Carbenoxolons sind auch bei seinen Nebenwirkungen nämlich Na-Retention und Hypokaliämie zu erkennen (11).

Bekanntlich hat Carbenoxolon antiulzeröse Wirkungen. Es ist heute nicht bekannt, auf welche Weise Carbenoxolon diese Wirkung ausübt. Diskutiert werden unter anderem ein Einfluß auf Bestandteile der Mucinschicht des Magens, speziell die N-Acetyl-Neuraminsäure im Sinne einer vermehrten Schleimproduktion (6), sowie eine direkte Wirkung des Carbenoxolons auf die DNA-Synthese der Magenschleimhaut. Carbenoxolon soll daher die gastrale Zellproliferation vermindern (6). In vorliegender Arbeit wurde letztere Hypothese an einem in-vitro-Modell überprüft. Untersucht wurden der Einbau von ^3H -Thymidin in die DNA und von ^{14}C -Leucin bzw. ^{14}C -Proteinhydrolysat in die Proteine der Magenschleimhaut mit und ohne Zugabe von Carbenoxolon. Als Versuchsobjekt dienten isolierte Mukosastückchen aus der Magenschleimhaut normaler und fastender Ratten sowie endoskopisch gewonnene Biopsiepartikel aus der Magenschleimhaut gesunder Probanden und von Patienten mit Ulcus ventriculi.

II. METHODIK

A. Gewinnung und Aufbereitung des Gewebes

Für die Tierversuche verwendeten wir Ratten des Inzuchtstammes Wistar. Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 24-26°C gehalten. Als unbehandelte Tiere erhielten sie Wasser und eine Standardnahrung (Herilan^R) ad libitum. Bei den klinisch-pharmakologischen Studien verwendeten wir Biopsien aus der Korpusschleimhaut des Magens gesunder Probanden und von Patienten mit endoskopisch nachgewiesenem Ulkus ventriculi (Die Biopsiepartikel wurden von der Medizinischen Klinik der Universität Erlangen-Nürnberg zur Verfügung gestellt).

Versuchsreihe 1: Bei den Tieren hatten wir 2 Versuchsgruppen. Die eine Versuchsgruppe wurde normal ernährt, der anderen Versuchsgruppe wurde das Futter 24 Stunden vor Versuchsbeginn entzogen. Trinkwasser stand ihnen immer ad libitum zur Verfügung. Die Ratten wurden durch Genickbruch getötet. Ihre Magenkorpusse wurden sofort entnommen und in mit eiskalter Tyrode-Lösung gefüllte Bechergläser gelegt. Die Tyrode-Lösung wurde vorher mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast; dadurch stellt sich bei 37°C ein pH-Wert von 7,4 ein. Dann wurden die Magenkorpusse aufgeschnitten, mit der Schleimhautseite nach oben auf Styroporplättchen gespannt und mit Tyrode-Lösung abgespült. Die Schleimhautoberfläche wurde mit einem Wattestäbchen abgetupft, um Nahrungsreste, Zelldetritus und Schleim zu lösen, und anschließend wurde das Medium gewechselt. Die Korpusschleimhaut wurde mit einem Skalpell vorsichtig von der Muskelschicht abgeschabt, mit der Schere gründlich zerkleinert und dann gewogen. Das gewonnene Material wurde 2x mit Tyrode-Lösung gewaschen, und anschließend bei 4°C kurz bis 1000 upm zentrifugiert, um Schleimreste abzutrennen. Das Gewebe wurde in 5 ml Plastikröhrchen mit eiskalter Tyrode-Lösung suspendiert (ca 1g Mukosa/ml Tyrode-Lö-

sung). Die Plastikröhrchen wurden mit Silikonstöpsel zugehalten und bis zum Beginn der Inkubation im Eiswasser gekühlt.

Versuchsreihe 2: Bei den Versuchen mit menschlichem Gewebe verwendeten wir Magenkorpusbiopsien, die unmittelbar nach Entnahme in eiskalter Tyrode-Lösung gekühlt, und wie oben beschrieben behandelt wurden.

B. Experimentelle und Biochemische Methodik

Da Tyrode-Lösung auch im Kühlschrank nur einen Tag aufbewahrt und deshalb vor jedem Versuch frisch angesetzt werden sollte, wurden sog. Stammlösungen, d.h. haltbare konzentrierte Salzlösungen hergestellt, die bei Bedarf verdünnt wurden.

Die Zusammensetzung der Stammlösungen:

Stammlösung I	: Natriumchlorid (NaCl)	200,0 g
	Kaliumchlorid (KCl)	5,0 g
	Calciumchlorid (CaCl)	5,0 g
	Magnesiumchlorid (MgCl)	2,5 g
	dest. Wasser ad	1000,0 ml
Stammlösung II	: Natriumhydrogen-	
	carbonat (NaHCO_3)	50,0 g
	dest. Wasser ad	1000,0 ml
Stammlösung III:	Natriumdihydrogenphosphat-	
	2-hydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	6,48 g
	dest. Wasser ad	1000,0 ml

Es wurden für 1 L fertige Tyrode-Lösung verwendet:

Stammlösung I	40 ml
Stammlösung II	20 ml
Stammlösung III	10 ml
Glukose	1 g
dest. Wasser ad	1000 ml

Die Versuchsansätze wurden ohne bzw. mit 0,5-5 mg/ml Carbenoxolon in Schüttelbad 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Über eine Injektionsnadel wurde durch den Silikonstöpsel des Plastikröhrchens Carbogen in die Suspension eingeleitet; über eine zweite Injektionsnadel strömte das Gas wieder ab. Die in-vitro-Versuche an isolierter Magenschleimhaut sollten zeigen, ob Carbenoxolon lokal die Syntheseraten von Protein und DNA zu beeinflussen vermag. Als Maß für die Syntheseraten dienten die Einbauraten von ^3H -Thymidin (Spezifische Aktivität: 1 Ci/mMol; Amersham, England) in DNA, und die Einbauraten von ^{14}C -Leucin (Spezifische Aktivität: 344 mCi/mMol; Amersham, England) bzw. ^{14}C -Proteinhydrolysat (Spezifische Aktivität: 55 mCi/mAtom Carbon; Amersham, England) in Protein. Im Proteinhydrolysat waren alle 20 Aminosäuren enthalten, die normalerweise in Proteinen vorkommen.

B.I. Bestimmung der Einbauraten von ^{14}C -Leucin bzw. ^{14}C -Proteinhydrolysat in die Proteine der Magenschleimhaut.

Zur Bestimmung der Protein-Syntheseraten wurde in die Suspension (Gesamtvolumen 1 ml) 0,02 ml eines ^{14}C -Leucins oder eines ^{14}C -Proteinhydrolysates zugesetzt, und 30 Minuten lang bei 37°C im Schüttelbad inkubiert. Während der Inkubation wurde Carbogen über eine Injektionsnadel in die Suspension eingeleitet; über eine zweite Injektionsnadel strömte das Gas wieder ab. Nach Ablauf der Gesamtinkubationszeit (30 + 30 = 60 Minuten) wurden die Proben im Eiswasserbad abgekühlt, und die Reaktionen durch Zugabe von 100 µl eiskalter 55%iger Trichloressigsäure (TCA) gestoppt, und das Gewebe durch Ultra-Schall homogenisiert. Die Proben wurden dann in 10 ml Glasgefäße überführt und mit 5%iger TCA auf 5 ml verdünnt und zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen, und die Rückstände zweimal mit 5%iger eiskalter TCA gewaschen, um die nicht in Protein eingebauten Ra-

dioaktiven Aminosäuren zu entfernen. Sie wurden mit Rührer homogenisiert. Danach wurden die Rückstände durch zweimalige Extraktion mit Äthanol-Diäthyläther 3:1 entfettet. Die Äthanol-Diäthyläther-Überstände aus der abschließenden Zentrifugation wurden verworfen, die Proteinrückstände an der Luft getrocknet und dann in 1 ml 0,01 N NaOH gelöst. Zur Bestimmung der ^{14}C -Aminosäure-Einbauraten wurden Radioaktivität und Eiweißgehalt dieser Lösungen gemessen. Zur Radioaktivitätsmessung verwendeten wir einen Flüssigkeitsszintillationsspektrometer (Isocop^R Searle, USA). Bei der Rattenmukosa wurden 0,2 ml Proteinlösung mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Insta-Gel^R, Hewlett-Packard, Frankfurt/M.) gemischt und im C-14-Kanal des Gerätes gemessen. Bei den menschlichen Biopsien wurden 0,6 ml Proteinlösung mit Szintillationsflüssigkeit gemischt. Die Ergebnisse, die als "counts per Minute (cpm)" angegeben wurden, berücksichtigen die Radioaktivität eines Leerwerts (0,2 ml 0,01 N NaOH in 10 ml Insta-Gel^R). Die Meßdauer betrug für jede Probe 4 Minuten, nachdem die Proben für eine Nacht stehengelassen wurden.

Die Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Lowry bestimmt. 0,1 ml Proteinlösung wurde in 2 ml Folin-Gebrauchslösung aufgenommen. Die Folin-Gebrauchslösung setzte sich zusammen aus 0,05 mMol CuSO_4 , 0,072 mMol K-Na-Tartrat und 18,5 mMol Na_2CO_3 in 100 ml Aqua dest.. Nach einer halben Stunde wurde die Probe mit 0,2 ml 1 N Phenol-Reagenz nach Folin-Ciocalteu versetzt. Dadurch entwickelte sich ein blaugrüner Farbstoff, dessen Extinktion nach 30 bis 60 Minuten im Spektralphotometer bei 578 nm gegen einen Leerwert gemessen wurde. Die Eiweißkonzentrationen wurden über einen mitgeführten Standard (1 mg Humanalbumin/ml 0,9% NaCl) berechnet und in mg Protein/ml angegeben. Alle Proteinbestimmungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Die ^{14}C -Leucin-Einbauraten und ^{14}C -Pro-

teinhydrolysat-Einbauraten wurden aus Radioaktivität und Proteingehalt der Lösungen berechnet und als cpm/mg Protein angegeben.

B.II. Bestimmung der Einbauraten von ^3H -Thymidin in die DNA der Magenschleimhaut.

Zur Bestimmung der DNA-Syntheseraten wurde in die Suspension (Gesamtvolumen 1 ml) 0,01 ml eines ^3H -Thymidins zugesetzt, und 30 Minuten lang bei 37°C im Schüttelbad inkubiert. Während der Inkubation wurde die Suspension mit Carbogen begast. Nach Ablauf der Gesamtinkubationszeit (60 Minuten) wurden die Proben im Eiswasser abgekühlt, die Reaktionen durch Zugabe von 100 μl eiskalter 55%iger Trichloressigsäure (TCA) gestoppt und das Gewebe durch Ultra-Schall homogenisiert. Die Proben wurden dann in 10 ml Glasgefäße überführt und mit 5%iger TCA auf 5 ml verdünnt und zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen, und die Rückstände zweimal mit 5%iger eiskalter TCA gewaschen, um die nicht in DNA eingebauten radioaktiven Thymidine zu entfernen. Danach wurden die Rückstände mit 2 ml 5%iger TCA 15 Minuten lang bei 90°C extrahiert. Während der Extraktion wurden die Glasröhrchen mit Glaskugeln abgedeckt. Nach der Extraktion wurden die Proben abgekühlt, und zentrifugiert. Die Überstände enthielten die Nucleinsäuren, deren Konzentration und Radioaktivität bestimmt werden konnten. Zur Bestimmung der Radioaktivität wurde 1 ml des Überstandes mit 10 ml Insta-Gel^R gemischt und im Tritium-Kanal des Flüssigkeitsszintillationsspektrometers gemessen. Bei jeder Messung wurde ein Leerwert (1 ml 5%ige TCA in 10 ml Insta-Gel^R) mitgeführt. Die Meßdauer betrug für jede Probe 4 Minuten, nachdem die Proben für eine Nacht stehengelassen wurden. Die Ergebnisse wurden auch in cpm angegeben. Die DNA-Konzentrationen wurden nach Burton bestimmt. Bei Rattengewebe wurden 0,5 ml DNA-haltiger Überstand mit 1,5 ml 5%iger TCA verdünnt,

bei den Menschenbiopsien wurden 1 ml DNA-haltiger Überstand mit 1 ml 5%iger TCA verdünnt, und dann mit 4 ml Burton-Reagenz (7,7 g Diphenylamin und 7,5 ml konzentrierte Schwefelsäure in 500 ml Eisessig) und 100 µl Aldehydlösung (1 N µl Acetaldehyd ad 10 ml Aqua dest.) versetzt. Die Ansätze wurden gründlich durchmischt und für einen Tag (24 Stunden) im Wärmeschrank bei 50°C inkubiert. Die Extinktion des entstandenen blauen Farbstoffes wurde im Spektralphotometer bei 595 nm gemessen, und mit Berücksichtigung des Leerwertes (2 ml 5%ige TCA mit 4 ml Burton-Reagenz und 100 µl Aldehydlösung). Die DNA-Konzentrationen wurden in "mg DNA/ml" angegeben, und über eine Eichkurve ermittelt. Die ³H-Thymidin-Einbausraten wurden in "cpm/mg DNA" angegeben.

Bei den beschriebenen in-vitro-Versuchen wurden jeweils 8-18 Kontrollgruppen mit Dosen von 0,5-5 mg/ml Carbenoxolon hinsichtlich der Protein- und DNA-Syntheseraten verglichen.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Tests nach Student. Unterschiede wurden als signifikant angesehen, wenn $P \leq 0,05$ war. Die Mittelwerte der Proben ergaben sich aus 8 bis 10 Einzelbestimmungen bei Ratten, und aus 8 bis 14 Einzelbestimmungen bei menschlichem Gewebe.

III. ERGEBNISSE:

A.I. Versuche bei normal gefütterten Ratten.

1. Der Einfluß von Carbenoxolon auf die in vitro DNA-Synthese der Magenschleimhaut normal gefütterter Ratten.

Wie aus der Abbildung 1 hervorgeht, bewirkten 2 und 5 mg Carbenoxolon/ml eine dosisabhängige Steigerung des Einbaus von ^3H -Thymidin in DNA der Magenschleimhaut der Ratten. Bei 0,5 mg Carbenoxolon/ml wurde keine signifikante Veränderung des ^3H -Thymidin-Einbaus gesehen.

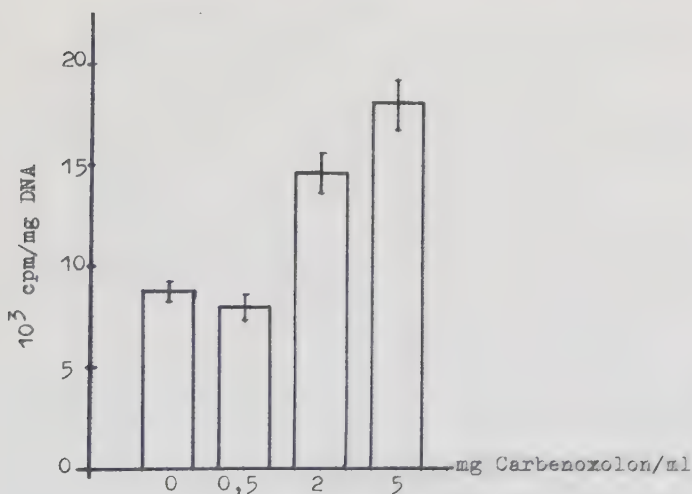


Abb. 1

Einfluß der DNA-Syntheserate in der Magenschleimhaut der Ratten durch Carbenoxolon.

In Tabelle 1 sind die Versuchsergebnisse mit Einbaerate als Originaldaten und DNA-Konzentration der Proben zusammengestellt.

Carbenoxolon (mg/ml)	Anzahl der Meßwerte	Mittelwerte der ^3H -Thyminidin- Einbauraten (10^3 cpm/mg DNA)	DNA-Konzentration (mg DNA/ml)
0	14	$8,76 \pm 0,51$	$0,124 \pm 0,009$
0,5	8	$7,97 \pm 0,57$	$0,157 \pm 0,019$
2	10	$14,63 \pm 0,98$	$0,130 \pm 0,007$
5	8	$18,08 \pm 1,23$	$0,149 \pm 0,010$

Tab. 1

Einfluß der DNA-Syntheserate in der Magenschleimhaut der Ratten durch Carbenoxolon.

2. Der Einfluß von Carbenoxolon auf die in vitro Protein-Synthese der Magenschleimhaut der normal gefütterten Ratten.

Abbildung 2 und Tabelle 2 zeigen die Protein-Syntheseraten in der isolierten Magenschleimhaut der Ratten. Es wurden bei den verschiedenen Konzentrationen (0,05, 0,5 und 5 mg/ml Carbenoxolon) keine signifikanten Veränderungen beobachtet.

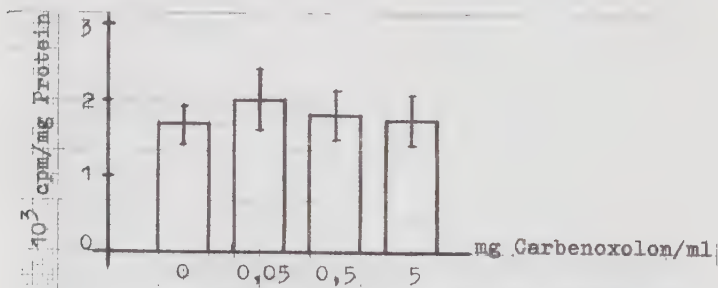


Abb. 2

Einfluß von Carbenoxolon auf die Protein-Synthese der Magenschleimhaut der normal gefütterten Ratten in vitro.

Carbenoxolon (mg/ml)	Anzahl der Meßwerte	Mittelwerte der ^{14}C - Leucin-Einbauraten (10^3 cpm/mg Protein)	Protein-Kon- zentration ($\frac{\text{mg Protein}}{\text{ml}}$)
0	18	$1,68 \pm 0,26$	$3,58 \pm 0,32$
0,05	9	$1,99 \pm 0,40$	$3,23 \pm 0,44$
0,5	10	$1,81 \pm 0,32$	$3,61 \pm 0,45$
5	9	$1,71 \pm 0,35$	$3,51 \pm 0,45$

Tab. 2

Einfluß von Carbenoxolon auf die Protein-
Synthese der Magenschleimhaut der normal
gefütterten Ratten in vitro.

A.II. Versuche bei 24 Stunden fastenden Ratten.

1. Der Einfluß von Carbenoxolon auf die in vitro DNA-
Synthese der Magenschleimhaut der 24 Stunden fastenden
Ratten.

Wie aus der Abbildung 3 hervorgeht, bewirkten
0,05 und 0,5 mg Carbenoxolon/ml keine signifikante
Veränderung der DNA-Synthese der Magenschleimhaut der
Ratten; bei den Konzentrationen 2 und 5 mg Carbenoxo-
lon/ml wurde eine dosisabhängige Steigerung der DNA-
Synthese gefunden, die im Vergleich zu der DNA-Syn-
these der Magenschleimhaut der normal gefütterten
Ratten deutlich höher liegt.

Die Versuchsergebnisse sind nochmals in Tabelle 3 zu-
sammengestellt.

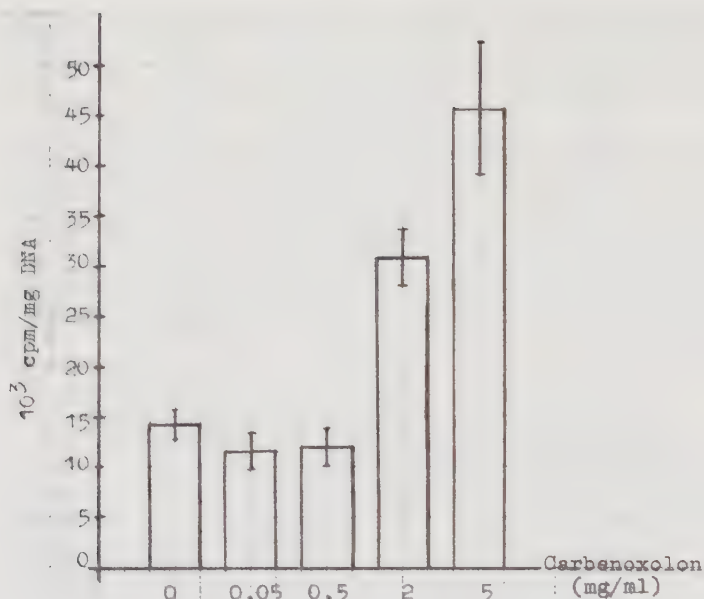


Abb. 3

Einfluß der DNA-Syntheserate in der Magenschleimhaut der 24 Stunden fastenden Ratten durch Carbenoxolon.

Carbenoxolon (mg/ml)	Anzahl der Meßwerte	Mittelwerte der ³ H- Thymidin-Einbauraten (10 ³ cpm/mg DNA)	DNA-Konzen- tration (mg DNA/ml)
0	15	14,26 ± 1,44	0,08 ± 0,008
0,05	8	11,44 ± 1,86	0,11 ± 0,019
0,5	8	12,08 ± 1,79	0,10 ± 0,013
2	10	30,79 ± 2,69	0,11 ± 0,011
5	8	45,41 ± 6,49	0,08 ± 0,016

Tab. 3

Einfluß der DNA-Syntheserate in der Magenschleimhaut der 24 Stunden fastenden Ratten durch Carbenoxolon in vitro.

2. Der Einfluß von Carbenoxolon auf die in vitro Protein-Synthese der Magenschleimhaut der 24 Stunden fastenden Ratten.

Abbildung 4 und Tabelle 4 zeigen, daß bei Konzentrationen von 0,05 mg/ml, 0,5 mg/ml, 2 mg/ml und 5 mg/ml Carbenoxolon keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu Kontrollen gefunden werden.

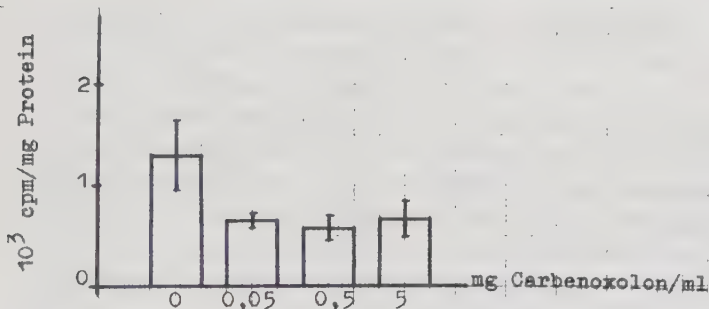


Abb. 4

Der Einfluß von Carbenoxolon auf die Protein-Synthese der Magenschleimhaut der 24 Stunden fastenden Ratten in vitro.

Carbenoxolon (mg/ml)	Anzahl der Meßwerte	Mittelwerte der ¹⁴ C- Leucin-Einbauraten (10 ³ cpm/mg Protein)	Protein-Kon- zentration ($\frac{\text{mg Protein}}{\text{ml}}$)
0	14	1,31 ± 0,36	3,78 ± 0,21
0,05	8	0,65 ± 0,08	3,55 ± 0,23
0,5	8	0,58 ± 0,12	3,86 ± 0,23
5	8	0,67 ± 0,18	4,67 ± 0,26

Tab. 4

Der Einfluß von Carbenoxolon auf die Protein-Synthese der Magenschleimhaut der 24 Stunden fastenden Ratten in vitro.

Aus den bisherigen Versuchen geht hervor, daß bei den Ratten durch Carbenoxolon die DNA-Synthese signifikant gesteigert wurde, während die Protein-Synthese keine Unterschiede zu den Kontrollen ohne Carbenoxolon aufwies.

B.I. Versuche bei magengesunden Menschen.

1. Der Einfluß von Carbenoxolon auf die DNA-Synthese der Magenschleimhaut bei magengesunden Menschen in vitro.

Abbildung 5 zeigt die DNA-Syntheseraten in der Magenschleimhaut der Menschen nach Vorbehandlung mit 5 mg Carbenoxolon gegenüber dem Kontrollversuch. Nach Behandlung mit Carbenoxolon wurde eine deutliche Steigerung der DNA-Syntheseraten gefunden, die mit einer Irrtumwahrscheinlichkeit $P < 0,05$ signifikant ist. Tabelle 5 zeigt die Zusammenfassung der Mittelwerte und die DNA-Konzentrationen.

Carbenoxolon (mg/ml)	Anzahl der Meßwerte	Mittelwerte der ^3H - Thymidin-Einbausraten (10^3 cpm/mg DNA)	DNA-Konzentration (mg DNA/ml)
0	7	$24,27 \pm 4,58$	$0,032 \pm 0,004$
5	7	$128,70 \pm 38,39$	$0,027 \pm 0,004$

Tab. 5

Der Einfluß von Carbenoxolon auf die DNA-Synthese der Magenschleimhaut bei magengesunden Menschen in vitro.

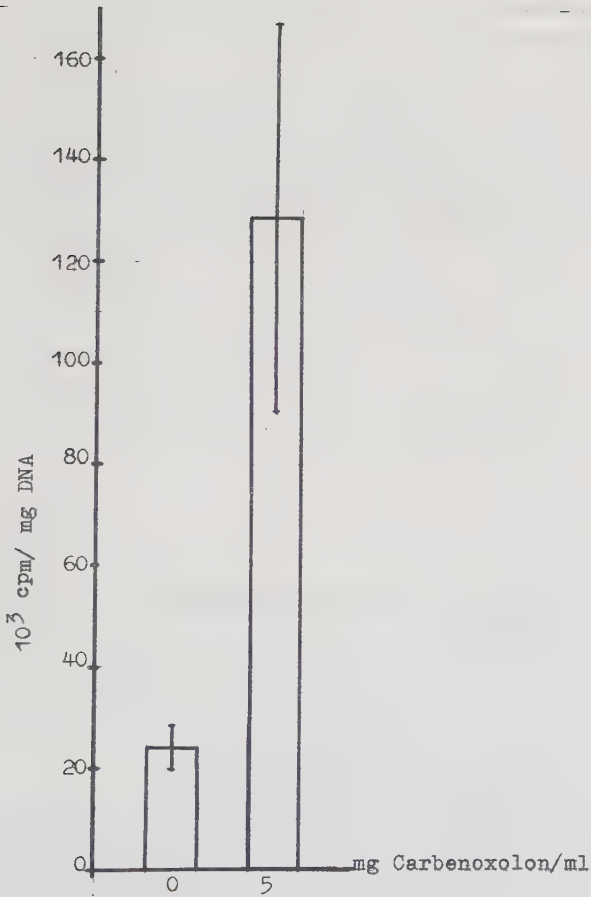


Abb. 5

Der Einfluß von Carbenoxolon auf die DNA-Synthese der Magenschleimhaut bei magengesunden Menschen in vitro.

2. Der Einfluß von Carbenoxolon auf die Protein-Synthese der Magenschleimhaut bei magengesunden Patienten in vitro.

Abbildung 6 und Tabelle 6 zeigen die Protein-Syntheseraten in der Magenschleimhaut gesunder Menschen bei Zugabe von 5 mg Carbenoxolon/ml. Es wurde nach Behandlung von Carbenoxolon eine Verminderung der Protein-Syntheseraten gefunden.

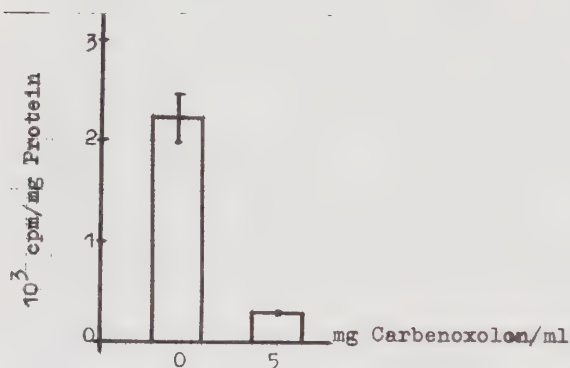


Abb. 6

Der Einfluß von Carbenoxolon auf die Protein-Synthese der Magenschleimhaut bei magengesunden Menschen in vitro.

Carbenoxolon (mg/ml)	Anzahl der Meßwerte	Mittelwerte der ¹⁴ C- Leucin-Einbauraten (10 ³ cpm/mg Protein)	Protein-Kon- zentration (mg Protein/ml)
0	13	2,23 ± 0,26	0,99 ± 0,13
5	14	0,29 ± 0,04	1,74 ± 0,13

Tab. 6

Der Einfluß von Carbenoxolon auf die Protein-Synthese der Magenschleimhaut bei magengesunden Menschen in vitro.

B.II. Versuche bei Ulkus-ventriculi-Patienten.

1. Der Einfluß von Carbenoxolon auf die DNA-Synthese der Magenschleimhaut von Ulkus-Patienten in vitro.

Bei Ulkus-Patienten haben wir ebenfalls gefunden, daß die DNA-Syntheseraten der Magenschleimhaut nach Behandlung mit Carbenoxolon erhöht waren. Im Vergleich zu magengesunden Patienten waren die Syntheseraten bei Ulkus-Patienten geringer gesteigert. Die Kontrollgruppe ohne Carbenoxolon-Vorbehandlung liegt signifikant niedriger als die Kontrollgruppe mit normaler Magenschleimhaut. Abbildung 7 zeigt den Einfluß von Carbenoxolon auf die DNA-Syntheseraten der Magenschleimhaut von Ulkus-Patienten. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

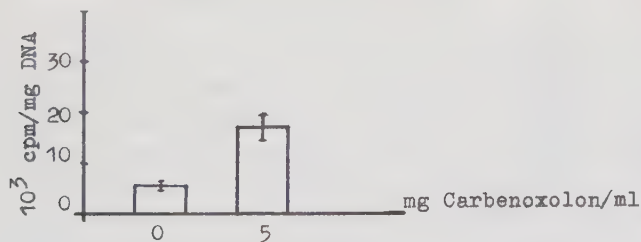


Abb. 7

Der Einfluß von Carbenoxolon auf die DNA-Synthese der Magenschleimhaut bei Ulkus-Patienten in vitro.

Carbenoxolon (mg/ml)	Anzahl der Meßwerte	Mittelwerte der ³ H- Thymidin-Einbauraten (10 ³ cpm/mg DNA)	DNA-Konzentration (mg DNA/ml)
0	8	5,64 ± 0,73	0,009 ± 0,001
5	8	16,95 ± 2,89	0,015 ± 0,013

Tab. 7

Der Einfluß von Carbenoxolon auf die DNA-Synthese der Magenschleimhaut bei Ulkus-Patienten in vitro.

2. Der Einfluß von Carbenoxolon auf die Protein-Synthese der Magenschleimhaut bei Ulkus-Patienten in vitro.

Wie aus der Abbildung 8 hervorgeht, führte Carbenoxolon in Konzentration von 5 mg/ml eine deutliche Verminderung der Protein-Syntheseraten in der Magenschleimhaut. Die Protein-Konzentration der Proben wurde nicht signifikant verändert. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 8 als Meßwerte zusammengestellt.

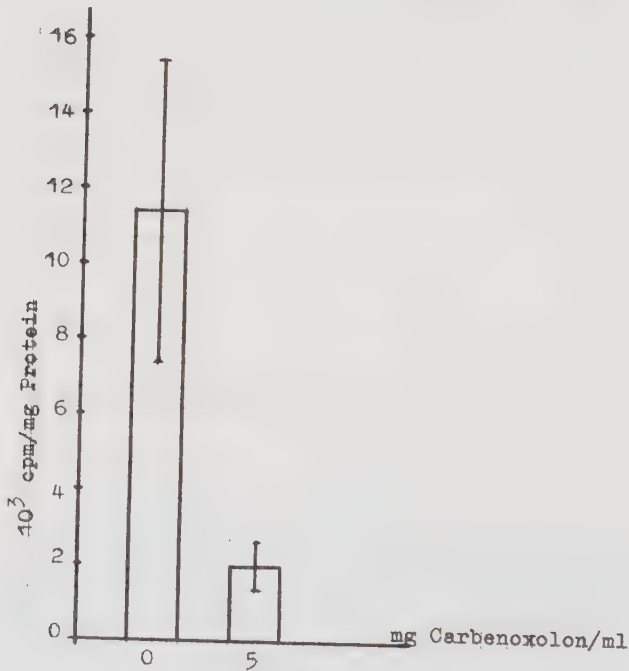


Abb. 8

Der Einfluß von Carbenoxolon auf die Protein-Synthese der Magenschleimhaut bei Ulkus-Patienten in vitro.

Die Protein-Synthese ist ohne Zusatz von Carbenoxolon gegenüber der normalen Magenschleimhaut signifikant erhöht.

Carbenoxolon (mg/ml)	Anzahl der Meßwerte	Mittelwerte der ^{14}C - Leucin-Einbauraten (10^3 cpm/mg Protein)	Protein-Kon- zentration (mg Protein/ml)
0	9	$12,81 \pm 5,02$	$1,01 \pm 0,12$
5	11	$2,27 \pm 0,75$	$1,32 \pm 0,17$

Tab. 8

Der Einfluß von Carbenoxolon auf die Protein-Synthese der Magenschleimhaut bei Ulkus-Patienten in vitro.

Betrachtet man die Wirkung von Carbenoxolon auf die DNA- und Protein-Synthese der Magenschleimhaut der Menschen zusammengefaßt, so ergibt sich folgendes Bild:

1. Ohne Behandlung mit Carbenoxolon wurde bei den Ulkus-Patienten eine im Vergleich zu den Kontrollen erniedrigte DNA-Synthese gefunden. Nach Behandlung mit Carbenoxolon stieg die DNA-Synthese der Magenschleimhaut bei den magengesunden Menschen zwar stärker an, als die der Ulkus-Patienten; Die Steigerung der DNA-Synthese bei den Ulkus-Patienten war jedoch so hoch, daß sich der Wert der DNA-Synthese-Einbauraten dem der DNA-Synthese-Einbauraten der Kontrollen ohne Carbenoxolon-Behandlung annäherte. Die beiden Werte unterschieden sich voneinander nicht signifikant. Das bedeutet, daß Carbenoxolon in vitro die Veränderung der DNA-Synthese der Magenschleimhaut bei Ulkus-Patienten aufzuheben vermag.
2. Ohne Behandlung mit Carbenoxolon wurde im Vergleich zu den magengesunden Patienten eine erhöhte Protein-Synthese der Magenschleimhaut bei den Ulkus-Patienten

gefunden. Nach Vorbehandlung mit Carbenoxolon wurde sowohl bei den magengesunden Patienten als auch bei den Ulkus-Patienten eine Abnahme der Protein-Synthese gefunden. Die Protein-Synthese bei den Ulkus-Patienten war nun so niedrig, daß der Wert der Protein-Einbausraten der Kontrollen ohne Carbenoxolon-Behandlung entsprach. Wie bei der DNA-Synthese wurde auch bei der Protein-Synthese gefunden, daß Carbenoxolon in vitro die Störungen der Protein-Synthese der Magenschleimhaut bei Ulkus-Patienten aufzuheben vermag.

IV. DISKUSSION DER VERSUCHSERGEBNISSE.

Unsere vorliegenden Versuche haben ergeben, daß Carbenoxolon (2-5 mg/ml) an der Magenschleimhaut der Ratte die in vitro DNA-Synthese signifikant zu steigern vermag. Dieser Effekt ist besonders deutlich, wenn 24 Stunden fastende Tiere für die Versuche verwendet werden. Die Ursache für diese Diskrepanz ist unklar. Man könnte vermuten, daß durch den mangelnden Kontakt mit Nahrungsstoffen die Schleimhautzellen des Magens für Proliferationsreize sensibilisiert werden. Auf die Protein-Synthese der Magenschleimhaut der Ratte war Carbenoxolon ohne Effekt. Dies scheint nur für die Protein-Synthese insgesamt, nicht aber für die Neosynthese einzelner Eiweißkörper zuzutreffen. Andere Autoren haben gefunden, daß unter Carbenoxolon der (1-¹⁴C)Galaktose-Einbau in die Glykoproteine der Magenschleimhaut der Ratten abnimmt. Diese Reduktion der Galaktose-Einbaurrate könnte darauf hinweisen, daß Carbenoxolon die Biosynthese eines veränderten Glykoproteins stimuliert, das mehr N-Acetylglukosamine und weniger Galaktose enthält. Spironolakton hebt den Ulkus-therapeutischen Effekt von Carbenoxolon auf (3). Die Behandlung von Ratten mit Spironolakton hat ergeben, daß Spironolakton einen gegenüber Carbenoxolon entgegengesetzten Effekt hat; es reduziert die Einbaurrate der N-Acetyl(³H)glukosamine und (1-¹⁴C)Galaktose in die Glykoproteine der Magenschleimhaut (9). Welcher der geschilderten Mechanismen für die Ulkus-therapeutische Wirkung von Carbenoxolon ausschlaggebend ist bzw. ob ein Zusammenspiel aller genannten Einflüsse erforderlich ist, kann nach den vorliegenden Daten noch nicht entschieden werden. Gesichert ist, daß auch bei der Ratte ein experimentellgesetztes Ulkus ventriculi unter der Behandlung mit Carbenoxolon beschleunigt abheilt (10). Andererseits kommt dem Carbe-

noxolon eine Schutzwirkung gegenüber durch Histamin oder Prednison ausgelösten Ulcera zu (2,8).

Betrachten wir nun unsere Untersuchungen am Menschen, so zeigt sich, daß Carbenoxolon hier sowohl die DNA-Syntheserate als auch die Syntheserate der Gesamt-Proteine der Magenschleimhaut verändert, und zwar im Sinne einer gesteigerten DNA- und erheblich verminderten Gesamtprotein-Synthese. Dieser Effekt ist grundsätzlich sowohl an der Magenschleimhaut gesunder Probanden als auch an der von Ulkusträgern nachzuweisen.

Normalerweise herrscht in der Magenschleimhaut ein Gleichgewicht zwischen aggressiven und schützenden Faktoren, dessen Störung die Entstehung von Erosionen und Ulcera hervorrufen kann. Die aggressiven Faktoren sind die Salzsäure-Konzentrationen und -menge sowie die enzymatische Aktivität des Pepsins im Magensaft. Als protektive Faktoren werden der Oberflächenschleim, die sekretorische Aktivität der schleimbildenden Zellen und Regenerationsfähigkeit der Epithelien und die Durchblutung des Magens angesehen. Eine erniedrigte Synthese des Oberflächenschleims, der durch eine Störung der Magenschleimhaut zustande kommt, stört natürlich das Gleichgewicht zwischen den aggressiven und protektiven Faktoren des Magens zu Gunsten der aggressiven Faktoren. So fanden Domschke, Classen und Demling, daß bei Patienten mit Ulkus ventriculi und Ulkus duodeni eine erhebliche Verminderung des Gehaltes an N-Acetylneuraminsäure (NANA) des Magenschleims gegenüber einer Kontrollgruppe ohne Ulkus vorlag. Die Qualität des Magenschleims ist aber wesentlich von der Zahl der NANA-Gruppen innerhalb der Mukoproteidmoleküle abhängig (5). Die gastrale Sekretion NANA-haltiger Glykoproteine war beim Ulkus-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant reduziert. Nach vierwöchiger Therapie der Ulkus-Patienten mit Carbenoxolon fand sich eine deutliche Steigerung der Sekretionsraten, die dann sogar

Normwerte übertreffen (4). Bei unseren Untersuchungen führt Carbenoxolon bei Ulkus-Patienten zu einer Verminderung der Gesamtprotein-Syntheserate bis auf Werte gleich Normalwerten gesunder Probanden. Es ist deshalb naheliegend, die kurative Wirkung des Carbenoxolons bei Ulkus-ventriculi-Patienten mit vermehrter Neosynthese einzelner Eiweißkörper, aber verminderter Gesamtprotein-Synthese in Verbindung zu bringen.

Weiterhin ist bekannt, daß Abschilferung von Zellen bei Ulkus-Patienten wesentlich höher ist als bei Gesunden. Eine vierwöchige Therapie mit Carbenoxolon führte zu signifikanter Reduktion des gastralen DNA-Verlustes (6). Wir finden bei Ulkus-Patienten eine Steigerung der DNA-Neosynthese durch Carbenoxolon. Die Verhältnisse normalisieren sich unter Carbenoxolon-Therapie. Diese Normalisierung der DNA- und Gesamtprotein-Synthese bei Ulkus-ventriculi-Patienten scheint für Carbenoxolon ein wesentlicher Teilfaktor seiner Ulkus-therapeutischen Wirksamkeit zu sein.

Weitere Untersuchungen werden zu klären haben, ob andere Mechanismen (etwa eine Beeinflussung der Prostaglandin-Synthese oder der Sekretion gastrointestinaler Hormone) zur anti-ulcerösen Wirkung von Carbenoxolon beitragen.

V. ZUSAMMENFASSUNG.

1. An normal gefütterten Wistar-Ratten wurde der Einfluß von 0,5-5 mg Carbenoxolon/ml auf die in vitro DNA- und Protein-Synthese der Magenschleimhaut untersucht. Es zeigte, daß Carbenoxolon in vitro die DNA-Synthese der Magenschleimhaut steigerte. Auf die Protein-Synthese der Magenschleimhaut hatte Carbenoxolon keinen Einfluß.

2. Weiterhin wurde der Einfluß von Carbenoxolon an 24 Stunden fastenden Wistar-Ratten auf die in vitro DNA- und Protein-Synthese der Magenschleimhaut untersucht. Dabei wurde nach Carbenoxolon-Behandlung eine starke Steigerung der DNA-Synthese der Magenschleimhaut gefunden. Die Protein-Synthese der Magenschleimhaut hatte sich nach Carbenoxolon-Behandlung nicht signifikant verändert.

3. Der Einfluß von Carbenoxolon (5 mg/ml) auf die in vitro DNA- und Protein-Synthese in biotisch gewonnenen Mukosastückchen von magengesunden Probanden sowie von Patienten mit Ulcus ventriculi wurde untersucht. Als Maß für die DNA- bzw. Protein-Synthese diente die Einbauraten von ^3H -Thymidin in die DNA (gegeben in cpm/mg DNA $\times 10^{-3} \pm \text{S.E.}$) bzw. von ^{14}C -Leucin oder ^{14}C -Proteinhydrolysat in die Proteine (gegeben in cpm/mg Protein $\times 10^{-3} \pm \text{S.E.}$) der Magenschleimhaut. Im Kontrollversuch an den magengesunden Probanden wurde durch Carbenoxolon die DNA-Synthese signifikant von $24,26 \pm 4,58$ auf $128,7 \pm 38,39$ gesteigert, und die Protein-Synthese von $2,23 \pm 0,26$ auf $0,29 \pm 0,04$ vermindert.

In der Magenschleimhaut von Ulcus-Patienten waren der in-vitro-Einbau von ^3H -Thymidin in die DNA ($5,64 \pm 0,73$) signifikant geringer, und der ^{14}C -Leucin-Einbau in die Proteine ($12,81 \pm 5,02$) signifikant höher als die entsprechenden Kontrollwerte von Magengesunden. Durch

Carbenoxolon wurde die DNA-Synthese auf $16,95 \pm 2,89$ gesteigert, und die Protein-Synthese auf $2,27 \pm 0,75$ vermindert. Beide Werte unterschieden sich nicht mehr signifikant von den Kontrollen der magengesunden Probanden. Diese Ergebnisse zeigen, daß Carbenoxolon in-vitro die Störungen der DNA- und Protein-Synthese der Magenschleimhaut zu normalisieren vermag. Es ist deswegen denkbar, daß dieser Effekt auch zur Ulkus-therapeutischen Wirkung des Carbenoxolons bei Ulkus-Patienten beiträgt.

VI. LITERATUR.

1. Baron J.H., Nabarro J.D.N., Slater J.D.H. and Tuffley R.:
METABOLIC STUDIES, ALDOSTERON SECRETION RATE AND PLASMA RENIN AFTER CARBENOXOLONE SODIUM.
Br. med. J., 2, 793 (1969).
2. Dean A.C.B.:
A Symposium on Carbenoxolone Sodium, 33 (1968).
3. Doll R., Langman M.J.S. and Shawdon H.H.:
TREATMENT OF GASTRIC ULCER WITH CARBENOXOLONE:
ANTAGONISTIC EFFECT OF SPIRONOLAKTONE
Gut, 9, 42 (1968).
4. Domschke W., Domschke S., Classen M., Demling L.:
SOME PROPERTIES OF MUKUS IN PATIENTS WITH GASTRIC ULCER. EFFECT OF TREATMENT WITH CARBENOXOLONE SODIUM.
Scand. J. Gastroenterol. 7, 647 (1972).
5. Domschke W. et al.:
Med. Welt 25, 493 (1974).
6. Domschke W., Domschke S., Hagel J., Demling L., Croft D.N.:
GASTRIC EPITHELIAL CELL TURNOVER, MUCUS PRODUKTION, AND HEALING OF GASTRIC ULCERS WITH CARBENOXOLONE.
Gut 18, 817 (1977).
7. Finney R.S.H. and Somers G.F.:
J. Pharm. Pharmac., 10, 613 (1958).

8. Hoffmeister W. and Hoffmeister A.W.:
Z. ges. exp. Med., 156, 195 (1971).
9. Johnston B., Lindup W.E., Shillingford J.S.,
Smith M. and Parke D.V.:
PHARMACOLOGICAL-BIOCHEMISTRY OF CARBENOXOLONE.
ITS EFFECTS ON GASTRIC MUCUS.
Fourth Symposium on Carbenoxolone.
10. Khan M.H. and Sullivan F.M.:
A Symposium on Carbenoxolone Sodium, 5 (1968).
11. Porter G.A.:
SYNERGISTIC EFFECT OF CARBENOXOLONE SODIUM
TRANSPORT IN TOAD SKIN.
Carbenoxolone Sodium, 33 (1970).
12. Sullivan F.M.:
PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY OF CARBENOXOLONE.
Carbenoxolone in Gastroenterology, 3 (1972).

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. P. Mitznegg
danke ich für die Überlassung des
Themas und die vielseitige Unter-
stützung bei der Durchführung
meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. C.-J. Estler
danke ich auch dafür, daß er mir
die Möglichkeit gab, die ganzen
Versuche in seinem Institut
durchführen zu lassen.

Lebenslauf

Ich, Gunawan SUTRISNO, wurde am 8. August 1951 als dritter Sohn des Kaufmanns Khing Hap THE und dessen Ehefrau Lianna Sari WIDJAJA in Jakarta geboren.

Meine Kindheit verbrachte ich im Elternhaus.

Von 1957 - 1963 besuchte ich die Volksschule.

Von 1964 - 1966 besuchte ich die Mittelschule.

Von 1967 - 1969 besuchte ich die Oberschule, in der ich nach 3jähriger Besuchsdauer mein Abitur mit Erfolg absolvierte.

Im August 1970 flog ich nach Deutschland.

Von 1971 - 1972 besuchte ich das Studienkolleg in München, wo ich nach 1jährigem Besuch die Feststellungsprüfung bestand. Im Sommer 1972 wurde ich an der Universität München für das Fach Physik immatrikuliert.

Im Wintersemester 1972/73 wurde ich an der Universität Erlangen-Nürnberg für das Fach Medizin immatrikuliert, wo ich 1975 die ärztliche Vorprüfung bestand.

1976 bestand ich den ersten Teil des Staatsexamens.

1978 bestand ich den zweiten Teil des Staatsexamens.

Im Mai 1979 bestand ich den dritten Teil des Staatsexamens.

